As "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" têm por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos das Ciências Biológicas, Médicas e Químicas, elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros.

São publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores.

The "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" are the vehicle of communication for original papers written by national and foreign specialists who contribute to the progress of Biological, Medical and Chemical Sciences.

They are published under the direction of the Editorial Board which assumes no responsability for statements and opinions advanced by contributors.

Indexado/Indexed: Biosis Data Base, Current Contents, Index Medicus.

Periodicidade: irregular
Permuta/Exchange: são feitas entre entidades governamentais, com publicações congêneres, mediante consulta prévia. Exchanges with similar publications can be settled with academic and governmental institutions through prior mutual agreement.
Endereço/Address. Instituto Butantan — Biblioteca. Av. Vital Brasil, 1.500
05504 — São Paulo, SP — Brasil
Telefone/Telephone: (011) 813-7222 — R. 129 — Telex: (011) 83325 BUTA-BR
Telefax: (011) 815-1505

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Estado da Saúde
Coordenação dos Institutos de Pesquisa
Instituto Butantan — São Paulo — SP — Brasil

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

Volume 53, número 1, 1991

São Paulo, SP — Brasil
1991

Mem. Inst. Butantan
53 (1), 1991

SUMÁRIO/CONTENTS

Mem. Inst. Butantán
53 (1):119-126, 1991

THE INFLUENCE OF THREE DIFFERENT DRYING PROCEDURES ON SOME ENZYMATIC ACTIVITIES OF THREE VIPERIDAE SNAKE *VENOMS*

Jürg MEIER
Christoph ADLER
Paul HÖSSLE
and Rosario LO CASCIO

ABSTRACT: Some enzymatic activities of lyophilized, sun-dried and vacuumdried venoms of copperhead *(Agkistrodon contortrix)*, saw-scaled viper *(Echis carinatus sochureki)* and lancehead *(Bothrops atrox)* snakes were determined and compared to the respective fresh venoms. It has been shown that none of the drying procedures has a general advantage over the others. It is concluded that the drying procedure used may influence the enzymatic activities of snake venoms to a different extent. It may be worthwhile to take the drying procedure into consideration, if snake venoms are used as enzyme source, since it may influence the yield of the enzyme to be purified.

KEYWORDS: Snake venoms; drying procedures; enzyme activities.

INTRODUCTION

It is known that dried snake venoms retain many of their biological activities over long periods of time[6, 8, 9, 10, 12]. Although this has never been demonstrated it is often said that lyophilized venoms are more stable than desiccator-dried venoms[11]. Low temperature processing and drying, however, are more complex scientifically and technologically than other drying procedures and the physicochemical changes which can take place during freeze-concentration and subsequent drying may be prominent[3, 4]. Thus, in this study the influence of lyophilization, vacuum-desiccation and sun-dryng on some enzymatic activities from venoms of the broad-banded copperhead *(Agkistrodon contortrix laticinctus)*, the

Pentapharm Ltd., CH-4002 Basel, Switzerland
Recebido para publicação em 25.6.1990 e aceito em 17.10.1990

saw-scaled viper *(Echis carinatus sochureki)* and the lancehead *(Bothrops atrox)* were investigated. Lyophilization and vacuum-desiccation are widely used laboratory procedures, where as sun-drying is a method used under field conditions.

MATERIAL AND METHODS

Snake venoms and drying procedures

Manual VENOM EXTRACTIONS were performed with *Agkistrodon contortrix laticinctus, Echis carinatus sochureki* and *Bothrops atrox* snakes. All animals were kept in our own snakefarm in Aesch, Switzerland. The venom pools obtained from some ten specimens of each snake species were divided into four aliquots and used in the experiments as fresh venom, lyophilized, vacuum-desiccated and sun-dried respectively. VACUUM-DESICCATION was performed in a vacuum-desiccator (Haereus, Zurich, Switzerland) during 4 hours under 10^{1} Torr vacuum at a temperature of 40°C and the water being removed via the pump. LYOPHILIZATION was performed in a lyophilizator (FC-600, LSL Secfroid, Lausanne, Switzerland). Before venom application, the apparatus was cooled down to -30°C. After deep freezing of the venoms to -45°C within 3 hours 20 minutes, the lyophilization processus with 10^{-2} Torr was finished 66 hours later with a final product temperature of +30°C. As a sun-drying procedure venom aliquots were dried for 5 hours outside under the sun on a sunny mid-July day in Aesch near Basel, Switzerland.

Experimental procedures

The dry weights were determined by weighing venom aliquots before and after the drying procedures on an analytical balance (Mettler, Greifensee, Switzerland). The dry weight of the fresh venom samples was estimated by calculating the mean of the dry weights obtained with the different drying procedures. The possible error of ± 5 % in this dry weight estimation was taken into consideration for the evaluation of the results. SDS POLYACRYLAMIDE GEL-ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE) was carried out in a PhastSystem electrophoresis unit (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The venoms (1mg venom per ml bidistilled water) were diluted 1+1 with sample buffer (10mM Tris/HC1, 1mM EDTA, 2.5% SDS, 0.01 bromphenolblue, pH 8.0). The sample volume applied to the gels (PhastGel Gradient 8-25%, Pharmacia, Sweden) was 1 µl. The running conditions were 250 V, 10mA, 3.0W, 15°C and 65Vh at the beginning and 50V, 0.1mA, 0.5V, 15°C and 0 Vh at the end of the experiment. L-AMINOACID OXIDASE ACTIVITY was manometrically determined in a differential respiro-meter (IG-14, Gilson, Middleton, USA) using 50 mM L-Phenyl-alanine (Sigma, St. Louis, USA) in 1/15 M Sorensen-phosphate buffer as the substrate. The vessels in which the enzymic reaction took place were shaked over a 60 minutes time period at 37°C and the oxygen consumption recorded at 10 minutes intervals. Venoms were used in a concentration of 1mg per ml bidistilled water. DETERMINATION OF ENZYME ACTIVITIES USING CHROMOGENIC SUBSTRATES were performed according to the method described by MEIER et al.[9]. For this purpose, 1.79ml of Tris-imidazole buffer (pH 8.4, ionic strength 0.15) and 0.01ml snake venom solutions were preincubated at 37°C in a disposable polystyrene cuvette. Then, 0.2ml of a 2 µM substrate solution were added and the change in absorbance at 405nm was photometrically recorded. The enzymatic release of p-nitroaniline per 3 minutes was measured (A/3 min) and converted into enzyme milliunits (mU)

MEIER, J.; ADLER, C.; HÖSSLE, P.; LO CASCIO, R. The influence of three different drying procedures on some enzymatic activities of three Viperidae snake venoms. **Mem. Inst. Butantan, 53**(1) 119-126, 1991.

by multiplication of this value by 6'667[9]. One international enzyme unit (U) is the amount of enzyme, which catalyses 1 μmole of substrate per minute under standardized conditions. Substrates with high specificity for thrombin (Chromozym[R] TH;Nα-Tosyl-Glycyl-L-Prolyl-L-Arginyne-p-nitroanilide-hydroacetate), plasma kallikrein (chromozym PK;Nα-Benzoyl-L-Prolyl-*L*-Phenylalanyl-*L*-Arginyne-*p*-nitroanilide-hydroacetate), glandular kallikrein (Chromozym GK; 2Hydroacetate-H-*D*-Valyl-L-Cyclohexylalanyl-*L*-Arginyne-*p*-nitroanilide), urokinase (Spectrozyme UK; Nα-Carbobenzoxy-*L*-Glutamyl (α-tertiary butoxy)-Glycyl-*L*-Arginyne-*p*-nitroanilide-hydroacetate) and plasmin (2Hydroacetate-H-*D*-Valyl-Phenylalanyl-*L*-Lysyne-*p*-nitroanilide *respectively were used.* All substrates are manufactured by Pentapharm Ltd. and distributed by Boehringer-Mannheim, FRG (Chromozym series) and American Diagnostica, USA (Spectrozyme substrate) respectively. The standard deviation of the test method has been evaluated with $\pm$ 8.5%. Thus, differences of more than $\pm$ 10% were judged being significant.

RESULTS AND DISCUSSION

The drying residues obtained with the different procedures vary within a comparatively small range only (Fig. 1). The high dry residues found support the hypothesis, that snake venoms are probably the highest concentrated secretory fluids produced by vertebrate organisms[2, 13]. The SDS-PAGE also did not reveal visible differences in molecular weight, indicating that no significant proteolytic degradation took place during drying (results not shown). This is, however, not surprising, since the electrophoretic pattern of all venoms investigated is very complex and it has been recently shown that e.g. the venom of *Agkistrodon contortrix* consists of some 80 different protein components[1]. When compared to fresh venom, every drying procedure led to a decrease in *L*-amino acid oxydase activity (figs. 2A, 3A, 4A). This confirms the labile character of this enzyme[5]. For two reasons the results of the experiments performed using chromogenic substrates have to be interpreted with some caution. Firstly, the different enzymes present in the venoms may interact synergistically. Thus, in contrast to the determination of *L*-amino acid oxidase activity, the activity measured with the chromogenic substrate may rather reflect the contribution of different venom components than the activity of on single enzyme. Consequently, the amidolytic activities measured may be attributed to known as well as to so far unrecognized venom proteinases. Secondly, it is not possible to correlate the amidolytic activities of venoms with the susceptibility of the substrates to mammalian proteinases[7]. However, although great caution was taken in interpreting these results, some interesting conclusions may be drawn. In the *Agkistrodon contortrix* venom, no significant differences were observed with the different drying procedures (fig. 2, B-F). A significant decrease in amidolytic activities was observed with sun-dried *Bothrops atrox* venom on the substrates for thrombin (fig. 3B) and urokinase (fig. 3D) respectively, whereas with this venom, no significant differences could be detected between vacuum-drying and lyophilization. The most striking differences were obtained with *Echis carinatus sochureki* venom (fig. 4). Obviously, there must a so far unrecognized inhibitor(s) be present in this venom, which will be destroyed during the drying procedures, thus leading to much higher enzymatic activities when compared to the fresh venom (fig. 4B, D, E, F). Surprisingly, sun — as well as vacuum-drying led to a significantly higher activity of the venom to the substrate for glandular kallikrein, whereas the activity of the lyophilized venom was in the same range as the fresh venom.

MEIER, J.; ADLER, C.; HÖSSLE, P.; LO CASCIO, R. The influence of three different drying procedures on some enzymatic activities of three Viperidae snake venoms. **Mem. Inst. Butantan, 53**(1) 119-126, 1991.

CONCLUSIONS

The drying precedure used may influence the enzymatic activities of snake venoms to a different extent. Thus, it may be worthwhile to take the drying procedure into consideration, if snake venoms are used as enzyme sources, since different enzymes present in the venom may be influenced in a different way according to the drying procedure used. Consequently, the drying procedure to which the snake venom is submitted may influence the yield of the enzyme to be purified.

RESUMO: Algumas atividades enzimáticas de venenos liofilizados, secos ao sol e secos a vácuo das serpentes *Agkistrodon contortrix*, *Echis carinatus sochureki* e *Bothrops atrox* foram determinadas e comparadas com os respectivos venenos frescos. Demonstrou-se que nenhum dos processos de secagem tem vantagem sobre os outros. Conclui-se que o processo de secagem usado pode influenciar as atividades enzimáticas dos venenos das serpentes até uma diferente extensão. Recomenda-se escolher o método mais adequado se os venenos de serpentes forem usados como fonte de enzimas.

UNITERMOS: Serpentes-venenos, processos de secagem, atividades enzimáticas.

REFERENCES

1. DYR, J.E.; SUTTNAR, J.; KORNALIK, F. Assessment of a complex mixture of interacting proteins in the coagulant active venom from *Agkistrodon contortrix contortrix*. *Folia Haematol.*, Leipizig, *115*: 203-207, 1988.
2. ELLIOTT, W.8. Chemistry and immunology of reptilian venoms. In: GANS, C. *Biology of the reptília*. New York, Academic Press, 1978. v.8. p.163-436.
3. FRANKS, F. *Biochemistry and biophysics at low temperatures*. Oxford, Cambridge University, 1985.
4. FRANKS, F. Improved freeze-drying; an analysis of the basic scientific principles. *Process Biochem.*, 24: S3, 1989.
5. IWANAGA, S. & SUZUKI, T. Enzymes in snake venoms. In: LEE, C.Y., ed. *Snake venoms*. 8erlin, Springer, 1979. p.61-158.
6. MACHT, D.I. Comparative toxicity of sixteen specimens of Crotalus venom. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *36*: 499-501, 1937.
7. MEIER, J.; STOCKER, K.; SVENDSEN, L.G.; 8ROGLI, M. Chromogenic substrates as possible tools in the characterization of Crotalidae and Viperidae snake venoms. *Toxicon*, *23*: 393-397, 1985.
8. RAMSEY, H.W. & GENNARO JR., J.F. An analysis of the toxicityand hemolytic properties of stored desiccated venoms of two Crotalidae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *8*: 552-556, 1959.
9. RUSSELL, F.E.; EMERY, J.A.; LONG, T.E. Some properties of rattlesnake venom following 26 years storage. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *103*: 737-739, 1960.
10. RUSSELL, F.E. & EVENTOV, R. Lethality of crude and lyophilized Crotalus venom. *Toxicon*, *2*: 81-82, 1964.
11. RUSSELL, F.E. *Snake venom poisoning*. Philadelphia, Lippincott, 1980. 562p.
12. SCHÖTTLER, W.H.A. On the stability of desiccated snake venoms. *J. Immunol.*, *67*: 229-304, 1951.
13. STOCKER, K. Composition of snake venoms. In: *Medical use of snake venom proteins*. 8oca Raton, CRC Press, 1990. p. 33-56.

MEIER, J.; ADLER, C.; HÖSSLE, P.; LO CASCIO, R. The influence of three different drying procedures on some enzymatic activities of three Viperidae snake venoms. **Mem. Inst. Butantan, 53(1)** 119-126, 1991.

LEGENDS TO FIGURES

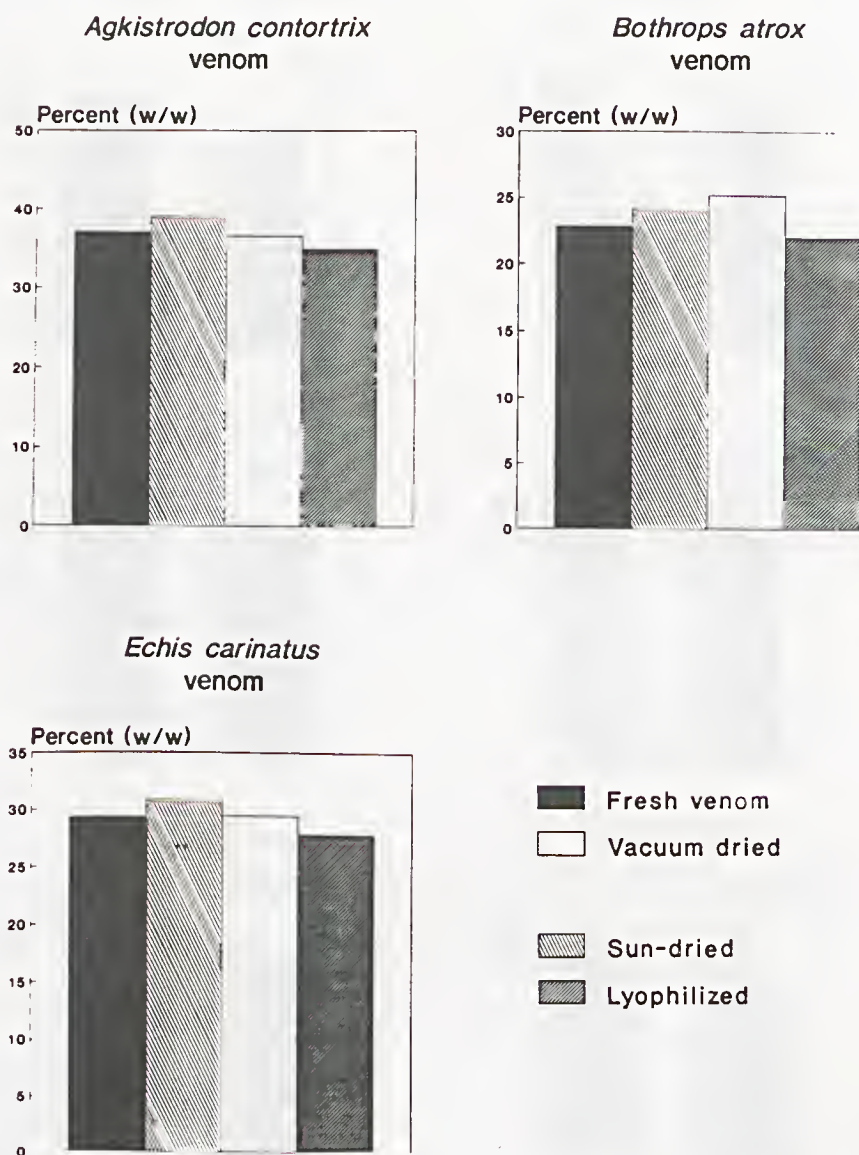



Fig. 1. Dry residues of the venoms. The differences between the values obtained were not significant.

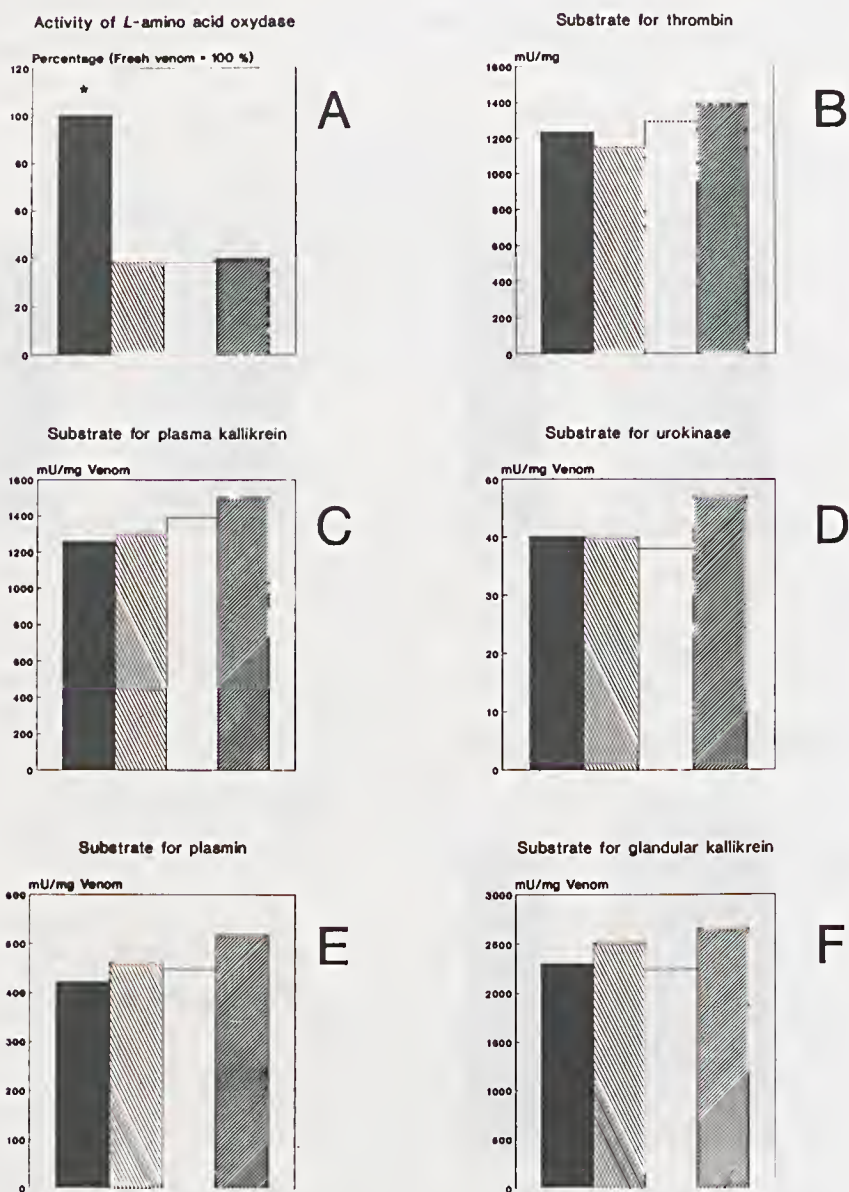



Fig. 2. Enzyme activities of *Agkistrodon contortrix* venom. With the exception of the L-amino acid oxidase determination, where every drying procedure leads to a significant activity decrease, all other differences are not significant with this venom.

MEIER, J.; ADLER, C.; HÖSSLE, P.; LO CASCIO, R. The influence of three different drying procedures on some enzymatic activities of three Viperidae snake venoms. Mem. Inst. Butantan, 53(1) 119-126, 1991.

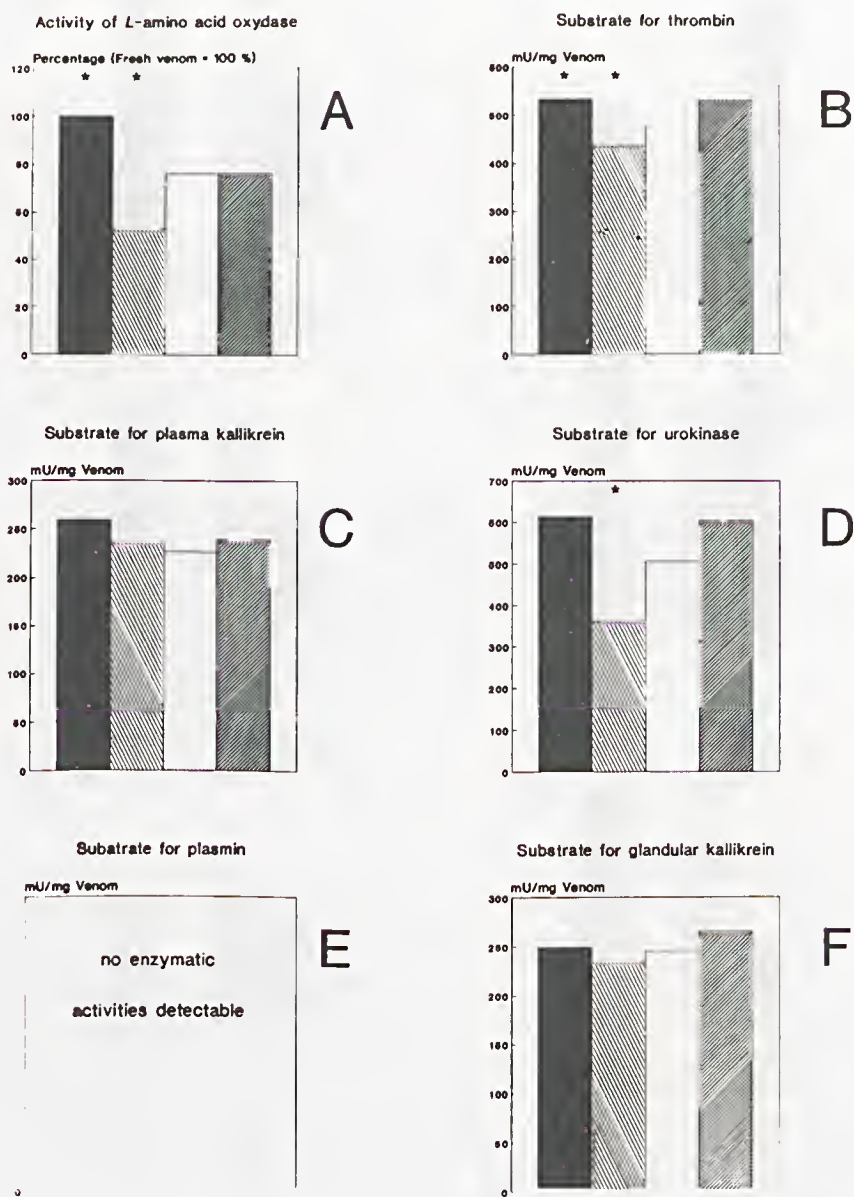



Fig. 3. Enzyme activities of *Bothrops atrox* venom. In comparison to fresh venom, sun-drying leads to a significant activity decrease of L-amino acid oxidase (A) and on the thrombin (B) and urokinase (D) substrates, respectively.

MEIER, J.; ADLER, C.; HÖSSLE, P.; LO CASCIO, R. The influence of three different drying procedures on some enzymatic activities of three Viperidae snake venoms. Mem. Inst. Butantan, 53(1) 119-126, 1991.

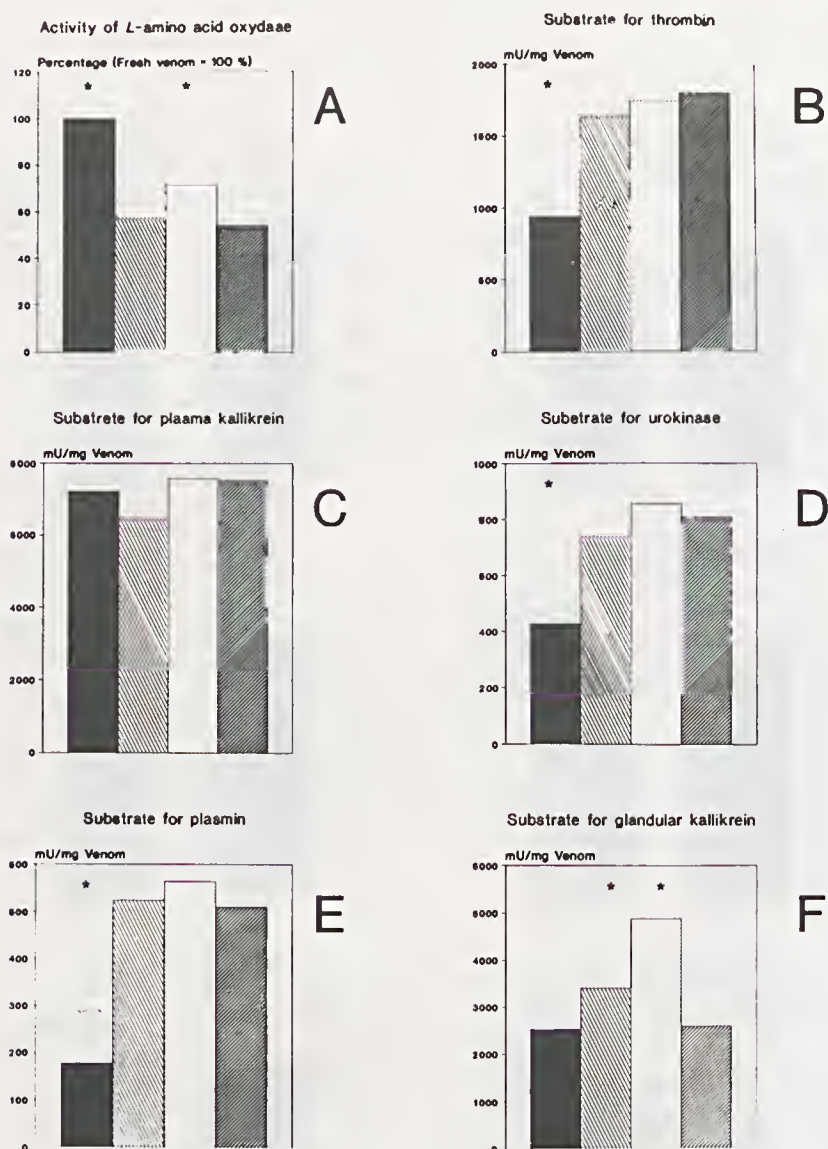



Fig. 4. Enzyme activities of *Echis carinatus* venom. The significant increase in activity observed with the thrombin (B), urokinase (D) and plasmin (E) substrates, respectively after drying, suggests the presence of one or more very labile inhibitors. Vacuum-drying seems to be the best drying procedure, in respect of enzyme activity as measured with the substrate for glandular kallikrein.

Mem. Inst. Butantan
53 (1):127-134, 1991

PADRÕES CROMÁTICOS, DISTRIBUIÇÃO E POSSÍVEL MIMETISMO EM *ERYTHROLAMPRUS AESCULAPII (SERPENTES, COLUBRIDAE)*

Otavio Augusto Vuolo MARQUES *
Giuseppe PUORTO * *

RESUMO: São reconhecidos nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil diferentes padrões cromáticos da serpente-coral *Erythrolamprus aesculapii*. Tais padrões foram aqui agrupados de acordo com a disposição de anéis coloridos ao longo do corpo, sendo possível perceber que diferentes grupos possuem distribuição geográfica distinta. Sugerimos, neste trabalho, que a distribuição geográfica desses grupos esteja relacionada à convergência mimética com as serpentes altamente venenosas do gênero *Micrurus*.

UNITERMOS: *Erythrolamprus aesculapii; Micrurus;* serpente-coral; distribuição geográfica; mimetismo.

INTRODUÇÃO

As tentativas para explicar a similaridade do padrão de colorido, em diferentes espécies de serpentes corais, têm sido assunto controverso. Inicialmente, Wallace [15] referiu-se a esse fenômeno como um mecanismo de defesa, de acordo com a teoria mimética de Bates [2]. Numerosas objeções à existência de mimetismo nesses répteis têm sido formuladas por vários autores: alguns sugeriram que o padrão de serpente-coral seria procríptico e não de advertência e a semelhança entre diferentes espécies seria o resultado de convergência evolutiva [3]. Outra objeção é que algumas espécies de corais seriam noturnas, dessa maneira, a sua cor de advertência não teria valor, não podendo servir como modelo para outras espécies [3, 8, 16]. Uma terceira objeção diz respeito à pretensa diversidade de distribuição geográfica entre as diferentes espécies de corais [3, 8].

Greene e McDiarmid [7] sintetizam várias evidências sobre serpentes-corais e contestam as objeções acima citadas. A coincidência de distribuição geográfica,

* Bolsista FEDIB — Instituto Butantan.
Pós-graduando do Depto. de Ecologia Geral — Instituto de Biociências — USP.
** Seção de Herpetologia. Instituto Butantan. Recebido para publicação em 05.10.1990 e aceito em 22.1.1991

com alguns exemplos mencionados por esses autores, parece ser um forte argumento a favor do mimetismo. Pough [10] faz uma revisão crítica de mimetismo em corais e outros répteis, adicionando argumentos favoráveis ao mimetismo entre serpentes. Além da semelhança do padrão de colorido, existem comportamentos característicos comuns a algumas espécies de corais, que incluem movimentos de cauda [4, 5, 6, 12], indicando que o mimetismo não estaria restrito apenas à coloração mas também a aspectos comportamentais.

O objetivo do presente trabalho é analisar diversos padrões cromáticos em *E. aesculapii* no sudeste do Brasil e tentar relacioná-los àqueles de espécies simpátricas de *Micrurus*, adicionando argumentos à sugestão de um complexo mimético neste grupo de serpentes [10, 12, 16].

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados exemplares de *E. aesculapii* da coleção herpetológica do Instituto Butantan (São Paulo — SP), do Museu de História Natural "Capão da Imbuia" (Curitiba — PR) e da Fundação Ezequiel Dias de Belo Horizonte (MG), que constituem uma amostra, principalmente das regiões sudeste e sul do Brasil. Não foram aproveitados os espécimes cujo padrão de coloração estivesse muito alterado devido à conservação em álcool. Foram analisados 306 espécimes (jovens e adultos de ambos os sexos) observando-se o padrão de disposição e conformação dos anéis. Foi analisada a folidose de cada exemplar, com objetivo de verificar se indivíduos com diferentes padrões cromáticos constituem uma mesma espécie. Paralelamente, foi realizado um levantamento das espécies do gênero *Micrurus* das regiões sudeste, centro-oeste e sul do Brasil, sendo também observado o padrão de disposição e conformação de anéis destas. Para isto foi utilizado o material da coleção do IB e MHN "Capão da Imbuia".

Além disso, observamos — em animais cativos — alguns aspectos do comportamento defensivo de *E. aesculapii* e de *Micrurus* spp.

RESULTADOS

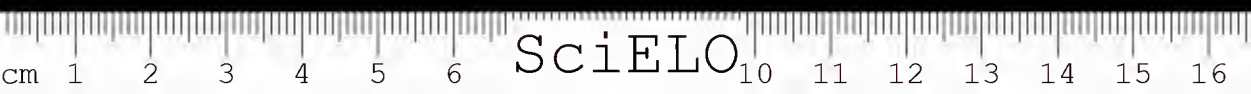
GRUPOS CROMÁTICOS DO PADRÃO DORSAL

De acordo com a disposição e conformação dos anéis coloridos em *E. aesculapii* é possível o arranjo dos indivíduos examinados em dois grupos distintos:

GRUPO I — Seqüência de dois anéis pretos separados por um branco (DÍADES), tendo cada um dos pretos contato com o vermelho (Figuras 1a e 2). Dentre o material examinado 184 espécimes pertencem a esse grupo, os quais foram coletados predominantemente no interior do continente (154 indivíduos) e o restante (30 indivíduos) em regiões litorâneas (Figura 5).

GRUPO II — Difere do anterior por possuir estreitos anéis brancos adicionais interpostos entre os pretos e os vermelhos; alguns espécimes apresentam fusão parcial dos anéis pretos na região dorsal e outros possuem esses anéis inteiramente fundidos (Figuras 1b, 1c, 1d). Dentre o material examinado 122 pertencem a esse grupo e todos foram coletados em regiões próximas do litoral (Figura 5).

ASPECTOS COMPORTAMENTAIS

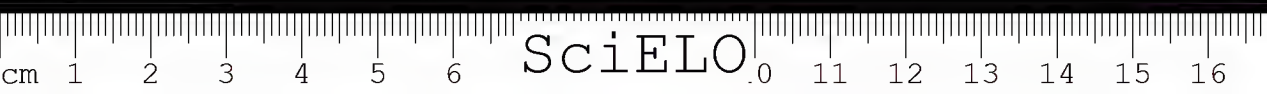
Quando perturbados com toques, ou aproximação brusca do observador, tanto indivíduos do grupo I como do grupo II, de *E. aesculapii*, enrodilham-se e realizam movimentos com a cauda, espiralada (Figura 2). O achatamento do corpo

também foi observado em alguns espécimes de ambos os grupos. (*M. frontalis*, *M. lemniscatus* e *M. corallinus*, ao serem perturbados, achatam o corpo, enrodilham-se e exibem a cauda parcialmente espiralada (Figura 4) — este último comportamento foi menos evidente e raramente observado em *M. corallinus.*)

DISCUSSÃO

Diversos autores admitem que serpentes com veneno, possivelmente letal aos seus predadores, não poderiam servir de modelo mimético, já que estes últimos, morrendo no primeiro contato, não chegariam a adquirir aversão por experiência desagradável[16]. Dessa maneira, faria sentido admitir que tanto as espécies altamente venenosas quanto as inofensivas seriam mímicas de uma espécie medianamente venenosa[16]. O gênero *Erythrolamprus,* geralmente opistóglifo[1, 11], provavelmente pode infligir mordidas dolorosas em seus predadores, sendo também caracterizado como medianamente venenoso[7, 9, 16]. Logo, essa espécie de serpente poderia ser considerada modelo para as espécies de *Micrurus* altamente venenosas e outras espécies não venenosas, como *Simophis rhinostoma,* hipótese proposta por Mertens e difundida por Wickler[16]. Todavia, Smith[13, 14] mostra em seus experimentos, realizados com pássaros predadores potenciais de répteis, que o padrão cromático das corais é evitado inatamente por esses predadores. A partir desses experimentos pode ser considerada a possibilidade de determinados predadores poderem distinguir, inatamente, as diferentes espécies de corais, através do padrão de diposição de anéis coloridos ao longo do corpo. Desse modo, esses predadores poderiam também reconhecer aquelas que são letais e que devem ser evitadas. A distinção desses padrões poderia ser também por aprendizado, no caso de predadores observarem a experiência fatal de outros[7]. Com base nessas considerações, seria plausível as *Micrurus* constituírem modelo para as *Erythrolamprus*. Além disso, Greene e McDiarmid[7] fornecem evidências de que o encontro entre *Micrurus* e seus predadores nem sempre resulta fatal para estes últimos, o que reforçaria a hipótese de *Micrurus* como modelo em certos complexos miméticos.

Essa hipótese, em que *Micrurus* serviria como modelo, estaria mais coerente com a distribuição geográfica observada no presente trabalho. De fato, o mapeamento (Figuras 5 e 6) demonstra que no interior do continente só ocorrem indivíduos de *Erythrolamprus* do grupo I — anéis escuros em díades (Figuras 1a e 2) — simpátricos com espécies de *Micrurus* com anéis em tríades *(M. frontalis* e *M. lemniscatus* — Figura 4) e anéis únicos *(M. corallinus* — Figura 3). Nenhuma dessas espécies de *Micrurus* parece copiar o padrão de *Erythrolamprus* — que têm anéis em díades. De acordo com certos autores (7), poder-se-ia admitir que as *Erythrolamprus* do grupo I (Figuras 1a e 2) seriam um padrão intermediário entre tríade e anel único. Ou, ainda, que devido à ausência dos anéis brancos estreitos entre os pretos e vermelhos, esses indivíduos do grupo I assemelhar-se-iam às *Micrurus* que possuem o padrão de anéis em tríades. Serpentes com este último padrão *(M. frontalis* e *M. lemniscatus* — Figura 4) parecem ocorrer no interior com mais freqüência que as de anel único *(M. corallinus* — Figura 3), pois 88% das espécies de *Micrurus,* recebidas do interior do Estado de São Paulo, pelo Instituto Butantan durante o período de 1984 a 1988, possuem tríades.

Em regiões próximas do litoral, *E. aesculapii* do grupo II (Figuras 1b, 1c, 1d) são simpátricas com *M. corallinus* (Figura 3) que é a espécie de *Micrurus* mais abundante nessas regiões (além de *M. decoratus,* espécie aparentemente rara e com distribuição mais restrita). Os indivíduos do grupo II (Figuras 1b, 1c e 1d) apresentam sempre anéis brancos estreitos, interpostos entre os pretos e ver-

melhos, alguns com tendência à fusão dos anéis pretos (Figuras 1c e 1d), imitando portanto o padrão de *M. corallinus* (Figura 3). Considerando válida a hipótese de que certos predadores reconheceriam os diferentes padrões de disposição de anéis, seria pertinente supor, ainda, que houvesse pressão seletiva favorável aos mímicos mais parecidos ao presumível modelo — *M. corallinus*. O mesmo poderia ser válido em relação aos indivíduos do grupo I, que imitariam outras espécies de *Micrurus* (com tríades), o que poderia explicar o baixo número de indivíduos de *Erythrolamprus* desse grupo oriundos da região litorânea, entre o material examinado.

Complementando dados de outros autores[4, 5, 6, 12], observamos que alguns espécimes de *E. aesculapii* (independentemente dos padrões cromáticos) realizam movimentos com a cauda, bem como o achatamento do corpo. Esses comportamentos também são observados em *M. corallinus* (observação pessoal). O movimento de cauda em *Erythrolamprus* assemelha-se àquele realizado por *M. frontalis*[4, 12], que exibe a cauda parcialmente espiralada, comportamento interpretado como um modo de despistar o predador (Figuras 2 e 4). Portanto, além da semelhança entre o padrão de coloração de *E. aesculapii* e diversas espécies de *Micrurus* no Sudeste brasileiro, certos padrões comportamentais também parecem estar envolvidos no mimetismo dessas corais[12].

CONCLUSÃO

Os dados obtidos e analisados neste trabalho sugerem que *E. aesculapii*, da Região Sudeste brasileira, mimetiza certas espécies de *Micrurus*, sendo essa semelhança mais acentuada na região oriental (Mata Atlântica), onde esse colubrídeo se assemelha a *M. corallinus*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Ivan Sazima pelo incentivo, sugestões e também pela leitura crítica do manuscrito. A Euclydes Marques pelas sugestões e críticas durante a elaboração do mesmo. A Miguel T. Rodrigues por algumas sugestões. A Marília Becker Angeli e Marília Seelaender pela versão em inglês. A Paulo E. Vanzolini pelas sugestões bibliográficas. Aos companheiros do M.H.N. Capão da Imbuia, por permitirem o exame do material deste museu, bem como o apoio e ajuda durante nossa estada no Estado do Paraná. Somos gratos também a todos aqueles colegas da Seção de Herpetologia do I.B. que direta ou indiretamente nos ajudaram durante a execução deste trabalho.

ABSTRACT: Various color patterns of the false coral snake, *Erythrolamprus aesculapii* have been described in the Southern, Southeastern and Central Western regions of Brazil. Such patterns are here grouped accordingly to the disposition of the colored rings along the body, which permits to establish a cleary defined geographic distribution for each group. We suggest that the geographic distribution of color pattern groups is related to mimicry of *Erythrolamprus* to some species of the highly venomous snake *Micrurus*.

KEYWORDS: *Erythrolamprus aesculapii; Micrurus;* coral snake; geographic distribution; mimicry.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, A. do. Serpentes do Brasil. 2 ed. São Paulo, Ed. Melhoramentos / Ed. Univ. São Paulo, 1978.

2. BATES, H.W. Contributions to an insect fauna of Amazon valley, lepidoptera: Heliconidae. *Trans. Linn. Soc. Lond, 23*: 495-566, 1862.
3. BRATTSTROM, B.H. The coral snake "mimic" problem and protective coloration. *Evolution, 9*: 217-219, 1955.
4. CARPENTER, C.C. & FERGUSON, G.W. Variation and evolution of stereotyped behaviour in reptiles. In: GANS & TINKLE. *Biology of the reptiles*; Ecology and Behaviour A. London, Academic Press, 1977. v. 7, p. 335-554.
5. DUELLMAN, W.E. The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Univ. Kans. Mus. Nat. Hist. Misc. Publ., 65*: 1-352, 1978.
6. GREENE, H.W. Defensive tail display by snakes and amphisbaenians. *J. Herpetol., 7*(3): 143-161, 1973.
7. GREENE, H.W. & MCDIARMID, R.W. Coral snake mimicry: does it occur? *Science, 213*: 1207-1212, 1981.
8. GROBMAN, A.B. An alternative solution to the coral snake mimic problem (Reptilia, Serpentes, Elapidae). *J. Herpetol., 12*: 1-11, 1978.
9. MACHADO, O. Variedade rara da *Erythrolamprus* encontrada no Rio. *Bol. Inst. Vital Brasil, 5*: 77-79, 1945.
10. POUGH, F.H. Mimicry and related phenomena. In: GANS & HUEY. *Biology of the reptiles*; Ecology B. New York, Alan R. Liss, 1988. v.16, p. 154-234.
11. ROZE, J.A. La taxonomia y zoogeographia de los ofídios en Venezuela. Caracas, Univ. Central de Venezuela, 1966.
12. SAZIMA, I. & ABE, A. Habits of five Brazilian species of snakes with coral-snake pattern, including a summary of their defensive tatics. (NO PRELO)
13. SMITH, S.M. Innate recognition of coral snake pattern by a possible avian predator. *Science, 187*: 759-760, 1975.
14. SMITH, S.M. Coral-snake pattern recognition and stimilus generalisation by naive great kiskadees (Aves: Tyrannidae). *Nature, 265*: 535-536, 1977.
15. WALLACE, A.R. Mimicry and other protective resemblance among animals. *The Westminster. Foreign Quarterly Review. New Series, 32*: 1-43, 1870.
16. WICKLER, W. *Mimicry in plants and animals*. London, Weidenfeld and Nicolson, 1968.

MARQUES, O. A. V. & PUORTO, G. Padrões cromáticos, distribuição e possível mimetismo em **Erythrolamprus aesculapii** (Serpentes, Colubridae). **Mem. Inst. Butantan, 53** (1):127-134, 1991.

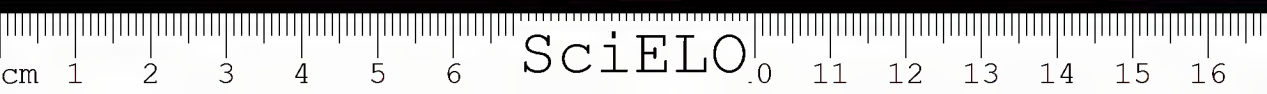



Fig. 1. Padrões cromáticos de *E. aesculapii*: a — GRUPO I/b,c,d — GRUPO II.
Fig. 2. *E. aesculapii* (Valinhos — SP), com padrão cromático do grupo I, realizando movimento com a cauda espiralada; note o corpo achatado dorso-ventralmente (Foto I. Sazima)
Fig. 3. *M. corallinus* (Florianópolis — SC), mostrando o padrão de anel preto único e a cauda espiralada.
Fig. 4. *M. frontalis* (Votorantim — SP) realizando movimento com a cauda e mostrando o padrão de anéis pretos em tríades; note cabeça parcialmente abrigada.

Fig. 5. Distribuição dos padrões cromáticos de *E. aesculapii*, no sul, sudeste e centro-oeste brasileiros.

MARQUES, O. A. V. & PUORTO, G. Padrões cromáticos, distribuição e possível mimetismo em **Erythrolamprus aesculapii** (Serpentes, Colubridae). **Mem. Inst. Butantan, 53** (1):127-134, 1991.

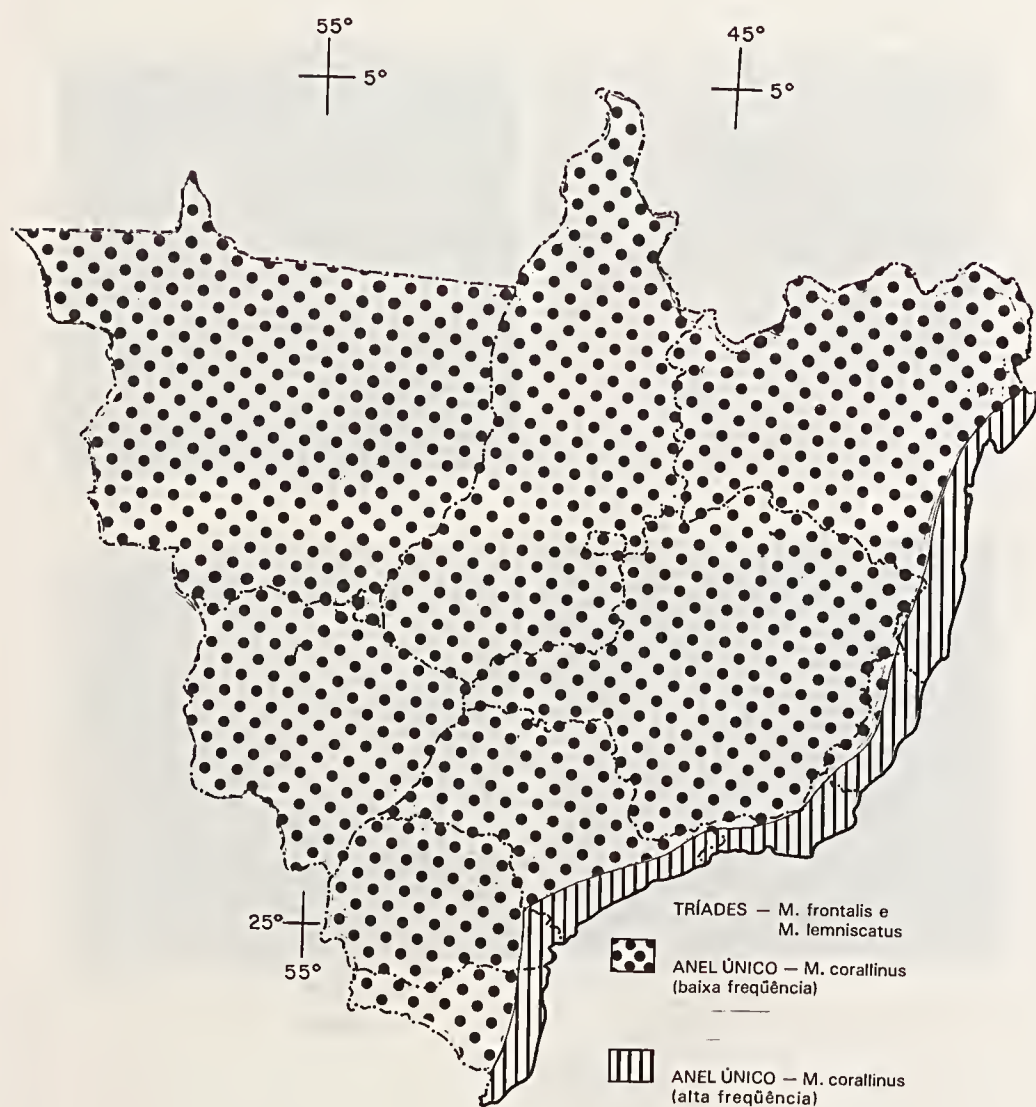



Fig. 6. Distribuição dos padrões cromáticos de *Micrurus* no sul, sudeste e centro-oeste brasileiros.

Mem. Inst. Butantan
53 (1):135-144, 1991

DUAS NOVAS ESPÉCIES DE *HYLA* DA FLORESTA ATLÂNTICA NO ESTADO DE SÃO PAULO (AMPHIBIA, ANURA)

José P. POMBAL JR.
Marcelo GORDO

RESUMO: São descritas duas novas espécies de *Hyla*, da Estação Ecológica da Juréia-Itatins, Mata Atlântica do Estado de São Paulo. *Hyla littoralis*, sp. n. e *Hyla jureia*, sp. n., são membros dos grupos *catharinae* e *rizibilis*, respectivamente.

UNITERMOS: *Hyla littoralis*, sp. n.; *Hyla jureia*, sp. n.; Sudeste do Brasil.

INTRODUÇÃO

Durante o levantamento das espécies de anfíbios anuros na Estação Ecológica da Juréia-Itatins, litoral sul do Estado de São Paulo, tivemos a oportunidade de observar e coletar indivíduos de duas espécies, do complexo *catharinae* (''sensu'' Lutz[11]) e do grupo *rizibilis* (''sensu'' Andrade e Cardoso[2]), que julgamos novas e passamos a descrever.

PROCEDIMENTO

As abreviaturas das coleções aqui citadas são: MNRJ (Museu Nacional, Rio de Janeiro), WCAB (Coleção Werner C.A. Bokermann, São Paulo) e ZUEC (Museu de História Natural da Universidade Estadual de Campinas).

Os exemplares adultos das novas espécies foram coletados manualmente, durante à noite e à luz de lanternas, dentro de mata. As desovas foram obtidas a partir da captura de casais em amplexo, mantidos em sacos plásticos com água e vegetação. O girino descrito foi mantido em aquário a partir da desova. As medidas, em milímetros, dos adultos e girino, foram tomadas com paquímetro e dos ovos com ocular micrométrica.

Departamento de Zoologia. IB. Universidade Estadual de Campinas. 13081 — Campinas-SP. Brasil
Recebido para publicação em 11.12.90 e aceito em 22.1.91.

POMBAL JR, J. P. & GORDO, M. Duas novas espécies de **Hyla** da Floresta Atlântica no Estado de São Paulo (Amphibia, Anura). **Mem. Inst. Butantan, 53** (1):135-144, 1991.

Descrição:

Hyla littoralis, sp. n.

Diagnose — Espécie de *Hyla* de pequeno porte (♂♂ 26,7 a 29,6; ♀♀ 38,3 a 39,9); pertencente ao complexo *catharinae*; saco vocal subgular; duas linhas brancas abaixo de cada olho; coxas barradas de preto sobre fundo branco.

Holótipo — ZUEC 8892, macho adulto proveniente do vale do Rio Verde, Estação Ecológica da Juréia-Itatins, Município de Iguape, Estado de São Paulo, Brasil (aprox. 24° 30'S, 47° 15'W), coletado entre 3 e 7. ix. 1988 por José P. Pombal Jr. e Marcelo Gordo.

Parátipos — Todos os parátipos coletados juntamente com o holótipo, a saber: MNRJ 14199, 14200, 14201, uma fêmea e dois machos, respectivamente; WCAB 49658-49660, uma fêmea e dois machos, respectivamente; ZUEC 8876, 8893, 8894, 8882-8891, 8880 onze machos e três fêmeas, respectivamente.

Descrição do holótipo — Porte esbelto (figura 1); comprimento da cabeça (10,9) pouco maior que 1/3 do comprimento total (28,9) largura da cabeça pouco menor que seu comprimento. Focinho em vista dorsal e lateral ligeiramente protuberante (figuras 3a e 3b); narinas salientes, localizadas na extremidade do focinho. Canto rostral evidente e ligeiramente côncavo. Olhos grandes, salientes; espaço interocular (2,4) menos de 1/4 da largura da cabeça (10,9). Tímpano ligeiramente ovalado. Saco vocal subgular pouco desenvolvido. Dentes vomerinos em duas séries separadas entre as coanas, que são elípticas. Língua oval livre nos bordos laterais e posterior, ligeiramente entalhada na porção posterior. Mãos com membrana interdigital reduzida (figura 3c); disco adesivo do primeiro dedo menor que os demais, os quais são pouco menores que o tímpano; um calo subarticular em cada dedo, sendo o do quarto dedo o maior. Calos metacarpais desenvolvidos, o mais externo dividido. O comprimento conjunto do fêmur e tíbia, pouco maior que o comprimento total. Discos adesivos dos artelhos (Figura 3d) de tamanho semelhante ao dos dedos; os discos do quarto e quinto artelhos são maiores que os restantes. Membrana interdigital pouco desenvolvida entre o primeiro e segundo artelho; nos demais atinge cerca de 2/3 do comprimento dos artelhos. Calos subarticulares e metatarsais desenvolvidos. Pele do ventre granulosa; dorso e flancos cobertos por tubérculos.

Medidas do holótipo — Comprimento total 28,9; comprimento da cabeça 10,9; largura da cabeça 9,0; diâmetro do olho 3,6; espaço interocular 2,4; distância olho-narina 3,0; diâmetro do tímpano 1,5; comprimento da coxa 15,0; comprimento da tíbia 16,5; comprimento do pé 12,8.

Coloração em vida — Coloração dorsal com desenho (Figura 1) castanho escuro sobre fundo castanho claro, faixa interocular marrom escura, que pode ser interrompida; abaixo dos olhos duas linhas brancas; iris acobreada com vermiculado preto; partes ocultas das coxas barradas de preto em fundo branco ou levemente esverdeado; ventre creme salpicado de marrom escuro. Os animais quando estão vocalizando podem apresentar tonalidades amareladas. Similarmente a algumas espécies do grupo *rubra*, mudanças para tonalidades amareladas durante a vocalização (Haddad e Sasima[9]), talvez sejam frequentes em *Hyla* do grupo *catharinae* e *rizibilis* uma vez que, além desta espécie, já observamos esta tonalidade em *Hyla rizibilis* Bokermann e em *Hyla hiemalis* Haddad e Pombal.

Variação — A série-tipo apresenta variação nas dimensões, no número e forma das calosidades das mãos e dos pés e na forma do desenho dorsal. Ocorre dimorfismo sexual no tamanho, sendo as fêmeas muito maiores que os machos.

Biologia — *Hyla littoralis*, sp. n., foi observada vocalizando de setembro a abril, sendo a época de maior atividade de vocalizações entre dezembro e janeiro.

Reproduz-se no interior de mata, em poças permanentes de água parada com fundo lodoso e grande quantidade de matéria orgânica, ou riachos semi-permanentes de fundo arenoso, com pouca correnteza e presença de poças pequenas ao longo do leito, onde há acúmulo de matéria orgânica. Nas noites de maior atividade de vocalização, machos vocalizando foram encontrados em riachos da água corrente e também em poças permanentes na região de restinga. Como sítios de vocalização são utilizados pequenos ramos ou folhas entre 60 e 170 cm acima do solo, podendo estar sobre a água ou afastado até cerca de dois metros de distância. *Hyla littoralis*, sp. n., começa a vocalizar antes do ocaso a, aproximadamente, 6 metros de distância da água. À medida que a noite se aproxima, os indivíduos se deslocam para as proximidades da água. Fêmeas ovadas foram vistas aproximando-se dos machos por volta das 21:00h..O amplexo é axilar. As desovas formam massas gelatinosas próximas à superfície da água, presas a ramos e folhas submersas. Durante o dia foram encontrados alguns indivíduos em repouso entre o folhedo no chão da mata, próximos aos sítios de vocalização. Não observamos *Hyla littoralis*, sp. n., acima de 200m de altitude.

Desova — Em setembro de 1989 obtivemos, em laboratório, duas desovas de dois casais de *Hyla littoralis*, sp. n.. Uma das desovas continha 398 ovos e outra 701. Os ovos mediam entre 1,1 e 1,5 mm de diâmetro e eram pretos.

Girino — Um girino no estágio 37 da tabela de Gosner[7], com 19,6 mm de comprimento total, possui o corpo (12,3) oval em vista dorsal (Fig. 4a) e levemente comprimido dorsoventralmente (Fig. 4b); narinas situadas superiormente, entre os olhos e o focinho; olhos dorso laterais, seu diâmetro menos da metade do espaço interocular (3,3); espiráculo do lado esquerdo, abaixo da linha mediana e na parte posterior do corpo; tubo externo reduzido; altura máxima da cauda pouco maior que a altura máxima do corpo; nadadeira caudal superior mais larga que a inferior; cauda lanceolada terminando em ponta arredondada; boca (Fig. 4c) ântero-ventral, com papilas labiais à sua volta, exceto na porção anterior do lábio superior; lábio superior com duas fileiras de dentículos córneos, sendo a interna interrompida na região mediana; lábio inferior com três fileiras contínuas de dentículos córneos.

Etimologia — O epíteto específico *littoralis* faz referência ao fato da série-tipo ter sido coletada em região litorânea.

Comparações com outras espécies — *Hyla angrensis* B. Lutz parece similar a *Hyla littoralis*, sp. n., a julgar pela descrição original (B. Lutz[10]). Conhecemos dois síntipos (MNRJ 2018 e MNRJ 2512), provenientes do município de Angra dos Reis, litoral Sul do Estado do Rio de Janeiro. Todavia, não sabemos o sexo destes exemplares ou, mesmo, se são adultos, o que prejudica uma comparação com nova espécie. Desta forma, preferimos descrever como nova esta população do litoral Sul do Estado de São Paulo, até que exemplares adicionais, provenientes de Angra dos Reis, possam esclarecer o *status* de *Hyla angrensis* B. Lutz e *Hyla littoralis*, sp. n..

Hyla littoralis, sp. n., é prontamente separada de *Hyla humilis* B. Lutz e *Hyla carnevallii* Carasmachi e Kisteumacher pelo maior tamanho (principalmente das fêmeas). Difere de *Hyla trapicheiroi* B. Lutz pelo maior desenvolvimento dos discos adesivos e pelo formato da mancha interocular. De *Hyla albicans* Bokermann difere pelo padrão de coloração mais escuro e pelo canto rostral menos côncavo. Pode também ser separada prontamente de *Hyla flavoguttata* A Lutz e B. Lutz e *Hyla heyeri* Weygoldt pela ausência de coloração alaranjada nas partes ocultas das coxas. A comparação com *Hyla catharinae* Boulenger é prejudicada, uma vez que o nome da localidade tipo ("Sierra do Catharina") não está associado

a nenhum nome atual de localidade, de maneira que é difícil aplicar o nome *catharinae* a qualquer população conhecida. Somente a comparação dos tipos de Boulenger com material proveniente de localidades do Estado de Santa Catarina poderá esclarecer o problema.

Hyla jureia, sp. n.

Diagnose — Espécie de *Hyla* de pequeno porte; machos e fêmeas de tamanho semelhante (♂♂ 29,0 a 30,0; ♀♀ 32,3 e 33,6); pertencente ao grupo *rizibilis* (saco vocal lateralizado); comprimento da coxa e da tíbia juntos maior que o comprimento total; mancha interocular com ápice voltado para trás.

Holótipo — ZUEC 8875, macho adulto proveniente do alto do maciço da Estação Ecológica da Juréia-Itatins (aprox. 24° 30'S, 47° 15'W; 300m alt.), município de Iguape, Estado de São Paulo, coletado entre 3 e 7. ix. 1989 por Marcelo Gordo.

Parátipos — MNRJ 14202, 14203 (dois machos); ZUEC 8863, 8864, 8865, 8868, 8869, 8870, 8872 (uma fêmea e seis machos, respectivamente) coletados no mesmo local e pelo mesmo coletor que o holótipo em 20 de fevereiro de 1990; ZUEC 8896 (fêmea) e WCAB 49662-49663 (uma fêmea e um macho, respectivamente) coletados no mesmo local que o holótipo em 6 de novembro de 1988 por C. Strüssmann; WCAB 49661, macho coletado na mesma ocasião que o holótipo.

Descrição do holótipo — Porte esbelto; comprimento da cabeça (10,4) mais que 1/3 do comprimento total (29,3); cabeça pouco mais comprida (10,4) que larga (9,5). Focinho em vista dorsal e lateral levemente acuminado (Figura 5a e 5b); narinas salientes e próximas à extremidade do focinho. Canto rostral evidente; região loreal côncova. Olhos salientes; espaço interocular (2,7) pouco menor que o diâmetro do olho (3,3). Tímpano ovalado, seu maior diâmetro mais que a metade do espaço interocular. Prega supratimpânica evidente. Saco vocal lateralizado, subgular e pouco desenvolvido. Dentes vomerinos em duas séries separadas entre as coanas; coanas elípticas. Língua livre nos bordos laterais e posterior, levemente entalhada na porção posterior. Mãos com membranas interdigitais vestigiais (Figura 5c); disco adesivo do 1º dedo menor que os demais, o disco adesivo do 3º dedo é aproximadamente do mesmo tamanho que o tímpano. Um calo subarticular em cada dedo, sendo o do quarto dedo o maior. Calos metacarpais pouco desenvolvidos. O comprimento conjunto da coxa (20,3) e da tíbia (16,1) maior que o comprimento total. Discos adesivos dos artelhos menores que os dos dedos; membrana interdigital entre o 1º e 2º artelhos pouco desenvolvida (Figura 5d), entre os demais é bem desenvolvida; calos subarticulares desenvolvidos, o do 1º, 2º e 3º artelhos de tamanho semelhante; calo metatarsal pouco desenvolvido. Pele do ventre granulosa. Pequenos tubérculos na cabeça (Figuras 5a e 5b).

Medidas do holótipo — Comprimento total 29,3; comprimento da cabeça 10,4; largura da cabeça 9,5; diâmetro do olho 3,3; espaço interocular 2,7; distância olho-narina 3,3; diâmetro do tímpano 1,6; comprimento da coxa 20,3; comprimento da tíbia 16,1; comprimento do pé 13,0.

Coloração do holótipo — Em álcool, a coloração dorsal é castanho-escuro com desenhos enegrecidos, pouco nítidos; região inguinal esbranquiçada com desenhos pretos; coxas com três barras pretas; ventre esbranquiçado salpicado de marrom-escuro.

Variação — A série-tipo apresenta variação nas dimensões e no número e forma das calosidades das mãos e pés. As fêmeas são pouco maiores que os machos.

Biologia — Encontramos *Hyla jureia*, sp. n., em atividade reprodutiva, em um riacho de água corrente com fundo pedregoso no interior de mata de galeria em campo de altitude, a aproximadamente 300m de altitude. Em visitas mensais, esta espécie foi observada em três ocasiões: 6.11.1988, 11.11.1989 e 20.2.1990. Vocalizam entre 10 e 50 cm de altura em pequenos ramos e folhas sobre o riacho. Aparentemente, preferem ramos que tenham uma das extremidades dentro da água. Observamos interações físicas, entre machos (figura 2), em disputas territoriais por sítios de canto. Os machos começam a vocalizar depois do ocaso; fêmeas ovadas foram vistas por volta das 21:00h..As desovas são depositadas próximas à superfície, formando massas aderidas aos ramos parcialmente submersos.

Desova — Obtivemos uma desova, em laboratório, entre 16 e 20.2.1990. Continha 120 ovos de coloração enegrecida, que mediam entre 1,3 e 1,4mm de diâmetro.

Etimologia — O epíteto específico *jureia* é um nome em aposição, do Tupi (juré + eia), que significa "maré alta que lava as pedras", sendo ao mesmo tempo parte do nome do local de coleta, Estação Ecológica da Juréia-Itatins.

Comparações com outras espécies — *Hyla jureia*, sp. n., difere de *H. obtriangulata* B. Lutz pelo menor tamanho das fêmeas; de *H. rizibilis* Bokermann, *H. brieni* De Witte e *H. luizotavioi* Caramaschi e Kisteumacher pelo maior tamanho dos machos e pela cabeça mais larga; difere de *Hyla ranki* Andrade e Cardoso pela mancha interocular mais desenvolvida, além do maior tamanho; de *H. hiemalis* Haddad e Pombal-Jr., pelas pernas maiores, mancha interocular maior e prega inguinal menos desenvolvida.

Comentários — Mantivemos uma atitude conservadora e não incluímos *Hyla littoralis*, sp. n. e *Hyla jureia, sp. n., no gênero Ololygon* Fitz., como proposto por Fouquette e Delahoussaye[6] para as espécies dos grupos *rubra, catharinae, rizibilis, perpusilla* e *rostrata*, com base em morfologia de espermatozóides. A morfologia de espermatozóides representa um critério questionável para a sistemática, dado o seu alto grau de variabilidade individual[1] e a probabilidade de agrupamento artificial das espécies[8]. Além disso, a utilização do nome genérico *Ololygon* apresenta problemas de ordem nomenclatural, uma vez que, pela análise da lista de sinonímia do gênero *Hyla* apresentada por Duellman[5], o gênero *Scinax* Wagler, 1830 teria prioridade sobre *Ololygon* Fitzinger, 1843. A espécie-tipo de *Scinax* é *Hyla aurata* Wied, a qual, segundo Bokermann[4], pertence ao grupo *rubra*; a espécie-tipo de *Ololygon* é *Hyla strigilata* Spix. Vale ressaltar que *H. strigilata* é um nome que atualmente não pode ser atribuído a nenhuma população conhecida[3], não sendo, portanto, possível reconhecer a espécie-tipo do gênero *Ololygon*.

AGRADECIMENTOS

Werner C. A. Bokermann, Adão J. Cardoso, Célio F. B. Haddad e Ivan Sazima pela leitura e sugestões ao manuscrito. Werner C. A. Bokermann e Ulisses Caramaschi pelo empréstimo de material. Erich A. Fischer, Wagner A. Fischer, Francisco A. M. Gimenez, Célio F. B. Haddad, L. Patrícia C. Morellato, Éllen C. P. Pombal pela ajuda no trabalho de campo. Christine Strüssmann pela ajuda no campo e no laboratório. Jaime Somera pelas ilustrações dos adultos e Adalberto Geraldini pelo desenho do girino. À SEMA e ao IBAMA pelo apoio logístico e pela autorização para trabalhar na Estação Ecológia da Juréia-Itatins; à CAPES pelo auxílio PICD a J. P. Pombal-Jr. (PG em Zoologia, UNESP — "Campus de Rio Claro") e CNPq pela bolsa a M. Gordo.

POMBAL JR, J. P. & GORDO, M. Duas novas espécies de **Hyla** da Floresta Atlântica no Estado de São Paulo (Amphibia, Anura). **Mem. Inst. Butantan, 53** (1):135-144, 1991.

ABSTRACT: Two small species of *Hyla*, from the Atlantic Forest at the southern portion of the State of São Paulo, Southeastern Brazil, are described as new. *Hyla littoralis, sp. n., and Hyla jureia*, sp. n., are allied to the *catharinae* and *rizibilis* groups, respectively.

KEYWORDS: *Hyla littoralis*, sp. n.; *Hyla jureia*, sp. n.; Southeastern Brazil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, C.G. & CARDOSO, A. J. Variabilidade em medidas de espermatozóides de *Hyla fuscovaria* (Amphibia, Anura) e seu significado taxonômico. *Rev. bras. Biol.*, *45*: 3B7-391, 19B5.
2. ANDRADE, G. V. & CARDOSO, A. J. Reconhecimento do grupo *rizibilis*; descrição de uma nova espécie de *Hyla* (Amphibia, Anura). *Rev. bras. Zool.*, *3*: 433-440, 19B7.
3. BOKERMANN, W. C. A. Das nuevas especies de *Hyla* del grupo *Catharinae* (Amphibia, Hylidae). *Neotropica*, *13* (41): 61-66, 1967.
4. BOKERMANN, W. C. A. Notas sobre *Hyla aurata* Wied, 1B24 (Anura, Hylidae). *Rev. bras. Biol.*, *29* (2): 159-162, 1969.
5. DUELLMAN, W. E. Liste der rezenten amphibien und reptilien: Hylidae, Centrolenidae, Pseudidae. *Das Tierreiche*, *95*: 19-225, 1977.
6. FOUOUETTE Jr., M. J. & DELAHOUSSAYE, A. J. Sperm morphology in the *Hyla rubra* group (Amphibia, Anura, Hylidae), and its bearing on generic status. *J. Herpet.*, *11*: 3B7-396, 1977.
7. GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae, with notes on identification. *Herpetologica*, *16*: 183-190, 1960.
B. HADDAD, C. F. B. & POMBAL Jr., J. P. *Hyla hiemalis*, nova espécie do grupo *rizibilis* do Estado de São Paulo (Amphibia, Anura, Hylidae). *Rev. bras. Biol.*, *47*: 127-132, 19B6.
9. HADDAD, C. F. B. & SAZIMA, I. Anfíbios anuros da Serra do Japi. In: MORELLATO, L. P. C., ed. *História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil.* Campinas, Editora da Unicamp. (no prelo)
10. LUTZ, B. New brazilian forms of *Hyla*. 1. Two new races of *Hyla catharinae*. *Bol. Mus. Nac. Rio de Janeiro. N. S. Zool.*, *288*: 1-7, 1973.
11. LUTZ, B. *Brazilian species of Hyla*. Austin/London, Univ. Texas Press, 1973. 260p.

Fig. 1. Macho adulto de *Hyla littoralis*, sp. n., em vida.

Fig. 2. Machos adultos de *Hyla jureia*, sp. n., em disputa territorial durante atividade reprodutiva.

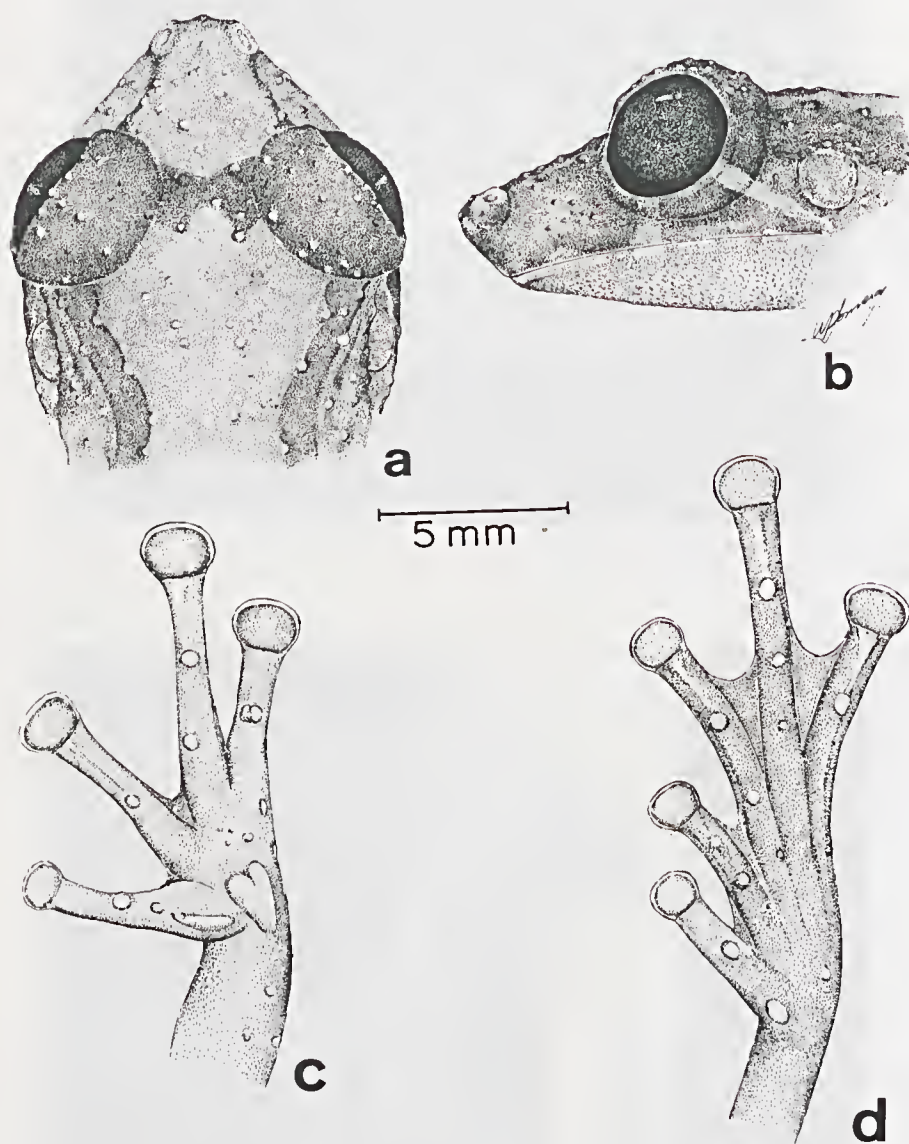



Fig. 3. Holótipo de *Hyla littoralis*, sp. n. Cabeça em vista dorsal (a) e lateral (b); mão (c) e pé (d) em vista ventral.

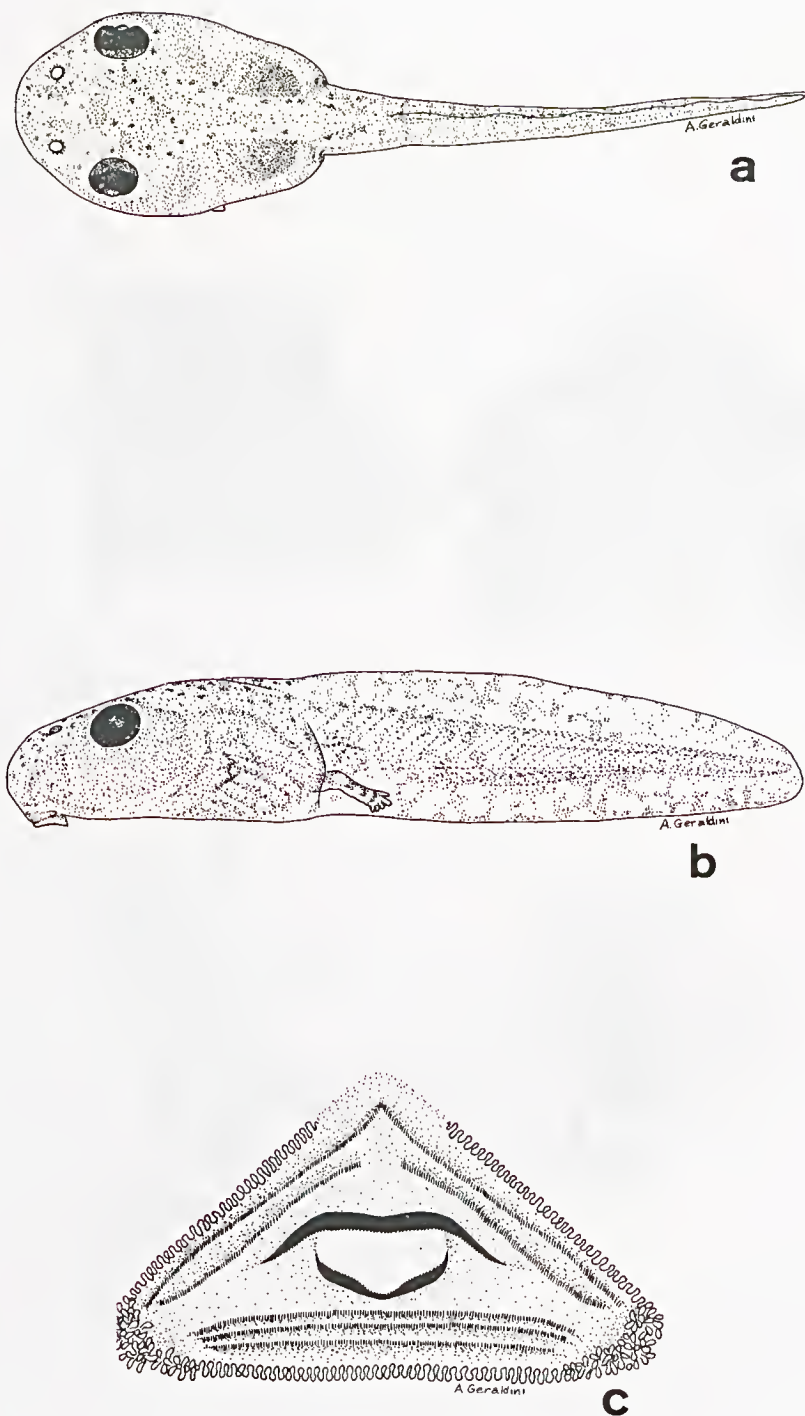



Fig. 4. Girino de *Hyla littoralis*, sp. n. (19,6 mm de comprimento-total). Vista dorsal (a) e lateral (b); detalhe da boca (c).

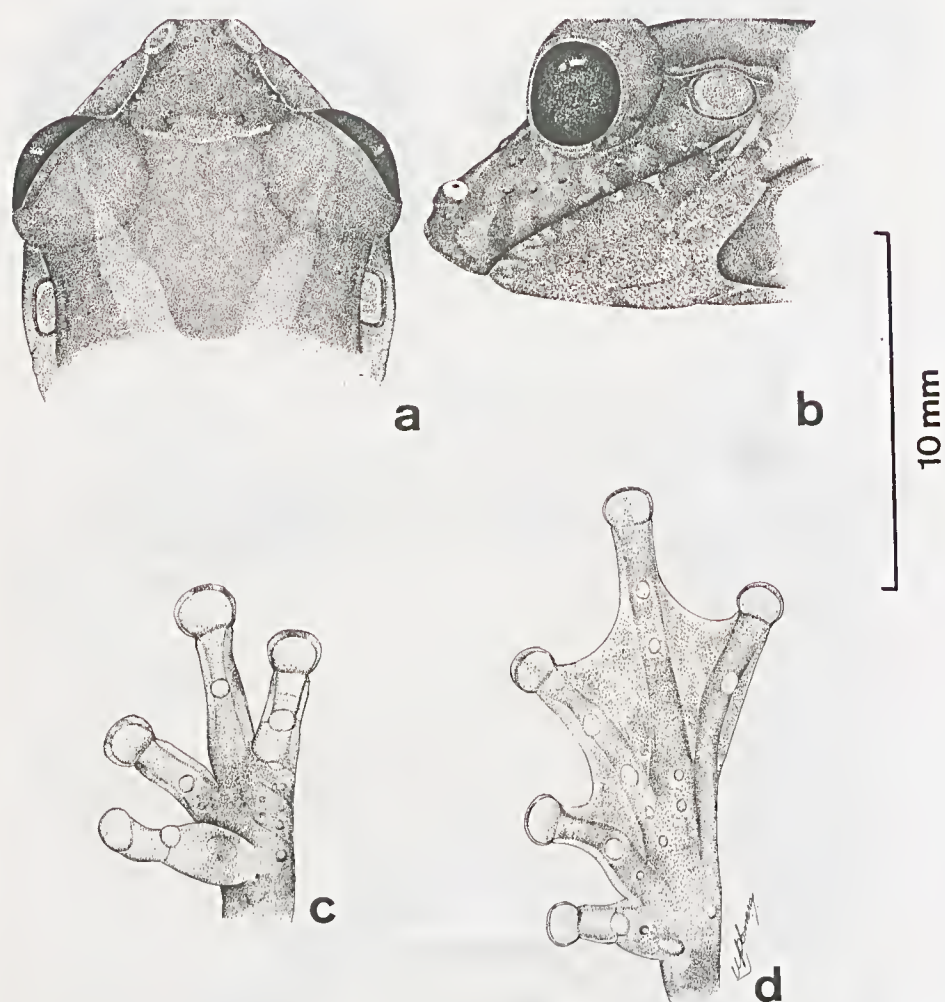
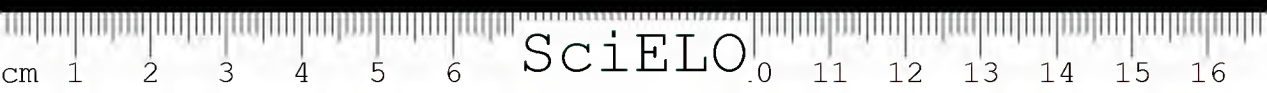



Fig. 5. Holótipo de *Hyla jureia*, sp. n.. Cabeça em vista dorsal (a) e lateral (b); mão (c) e pé (d) em vista ventral.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. Somente serão aceitos trabalhos inéditos e que se destinem exclusivamente à revista. É proibida a reprodução com fins lucrativos. Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.
2. Os trabalhos deverão ser redigidos em português, inglês ou francês, datilografados preferencialmente em máquina elétrica, em espaço duplo em 3 (três) vias, em papel formato ofício e numerados no ângulo superior direito.
3. No preparo do original será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura: **Página de rosto:** título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e filiação científica. **Texto:** introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referência bibliográfica. **Material de referência:** resumos (em português e inglês); unitermos (palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo; devem ser incluídas até um limite máximo de três, em português e inglês).
4. As referências bibliográficas deverão ser ordenadas alfaheticamente e numeradas.
   Exemplos:
   Para livros: autor, título, edição, local de publicação, editor, ano, páginas.
   7. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Para artigos: autor, título do artigo, título do periódico, volume, página inicial e final, ano.
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F.º, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, 40/41:** 1-9, 1976/77.
   As citações no texto devem ser por números-índices correspondentes às respectivas referências bibliográficas.
   Exemplos:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. As ilustrações (fotos, tabelas, gráficos etc.) deverão ser originais e acompanhadas de legendas explicativas. As legendas serão numeradas e reunidas em folha à parte. Os desenhos deverão ser a nanquim e as fotografias bem nítidas, trazendo no verso o nome do autor e a indicação numérica da ordem a ser obedecida no texto. As ilustrações deverão ser organizadas de modo a permitir sua reprodução dentro da mancha da revista (22 x 12,5cm).
6. Os artigos deverão conter no máximo 6 (seis) ilustrações (branco e preto). De cada trabalho serão impressas 50 (cinqüenta) separatas, sendo 10 para a Biblioteca do Instituto e 40 para os autores.
7. Os textos originais não serão devolvidos e os originais das ilusrações estarão à disposição dos autores.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. Manuscripts submitted to the Editorial Board should be unpublished texts and should not be under consideration for publication elsewhere. Reproduction for commercial purposes is not allowed. The Editorial Board will plan the publication of revision articles.
2. The original and two copies of papers should be typewritten in Portuguese, English or French, double spaced, on typing paper (31 x 21cm). Pages should be numbered consecutively at the upper right corner.
3. The following structure should be considered in the preparation of the manuscript: **Title page:** with article title, name of author(s), professional address. **Text:** with introduction, material and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments, references, abstracts (in Portuguese and English), and keywords. A maximal number of 03 keywords should be included in Portuguese and English.
4. References in alphabetical order should be numbered consecutively.
   Examples:
   Books
   7. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Articles
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F.º, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, 40/41:** 1-9, 1976/77.
   Citations in the text should be identified by the reference number.
   Examples:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. Illustrations (photographs, tables, figures etc.) should be the originals and legends should be submitted typewritten on a separate sheet. Line-drawings should be with China ink and photographs must be of top quality. On the back of each figure or photograph the name of the author(s) should be lighly written and the number indicating the sequence in the text. Illustrations should fit in a page measuring 22 x 12,5cm.
6. No more than 6 illustrations will be accepted and photographs should be black and white. Fifty reprints of each article are provided without charge, and 10 will be kept at the library.
7. Submitted manuscripts will not be returned to the author(s) but the original illustrations are available to author(s) by request.